

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Seroprevalencia y riesgo de infección de leptospirosis
bovina en una localidad de costa y otra de sierra**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Luis Antonio Llanco Albornoz

ASESOR

Francisco Suárez Aranda

Lima - Perú

2007




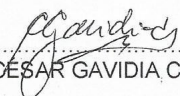
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral:

N.º 034-EAPMV/FMV-2007.

PRESIDENTE : 
JOSÉ CAMACHO SALCEDO

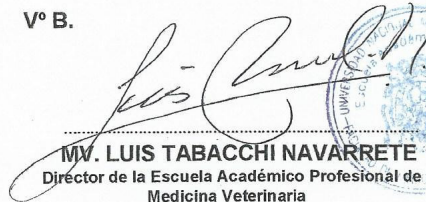
MIEMBROS : 
FRANCISCO SUÁREZ ARANDA
Director de la Tesis

: 
CESAR GAVIDIA CHUCÁN

: 
NIEVES SANDOVAL CHAUPE

San Borja, 22 de Mayo de 2007.

Vº B.


M.V. LUIS TABACCHI NAVARRETE
Director de la Escuela Académico Profesional de
Medicina Veterinaria





UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL
TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO**

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **Martes 22 de Mayo del 2007**, a las **12:00 horas**, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N.º034-EAPMV/FMV-2007, integrado por los siguientes profesores:

JOSÉ CAMACHO SALCEDO,	Presidente del Jurado.
FRANCISCO SUÁREZ ARANDA,	Director de la Tesis
CÉSAR GAVIDIA CHUCÁN,	Miembro del Jurado
NIEVES SANDOVAL CHAUPE,	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **Luis Antonio Llanco Alborno**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

**“SEROPREVALENCIA Y RIESGO DE INFECCIÓN DE LEPTOSPIROSIS
BOVINA EN UNA LOCALIDAD DE COSTA Y OTRA DE SIERRA”**

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Director de Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECIOCHO (18)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:10 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

José Camacho Salcedo; MV. Prof. Asociado, T.C

Francisco Suárez Aranda; PhD. Prof. Principal, D.E

César Gavidia Chucán; MPH. Prof. Asociado, D.E

Nieves Sandoval Chaupe; Mg. Prof. Asociada, D.E.



AGRADECIMIENTOS

Al Dr Francisco Suárez por sus consejos, apoyo y paciencia en la elaboración de esta tesis.

Muchas gracias.

A la Dra Hermelinda Rivera y el personal del Laboratorio. Por las facilidades brindadas en el desarrollo de esta tesis.

A Goyo, nena y Katty. Los hermanos que siempre quise y tuve la suerte de tener.

Por cada pelea, tristeza y alegría compartida. Por estar ahí cuando se les necesita.

A Pepito y el que está por venir. Por la forma con que llenan nuestras vidas de amor.

A mis “quistes”. César, Lucho, Dante y Marcel.

Por todos y cada uno de los momentos compartidos, por las bromas cuando reniego y ser como los hermanos que no pude tener.

Para Zulma y Manuel. Mis grandes amigos.

A los Doctores Jane, Wheeler, Raúl Rosadio y Lenin Maturrano.

Por sus enseñanzas, consejos y amistad.

A Álvaro, David, Hugo, Jesús y Pablo.

Por permitirme formar parte del SICSA. Por las buenas y malas que hemos pasado juntos.

A Feliciano, Antonio y Emilio. Que cuidan nuestros sueños y días.

A mamá Mechita y mis tíos Víctor, Liz, Malena. La gran familia que tengo fuera de casa.

A Dios. El hacedor de todo y fuente interminable de amor y esperanza. Todo nace y vuelve a él.

ÍNDICE

RESUMEN

SUMMARY

LISTA DE TABLAS

LISTA DE FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. GÉNERO *Leptospira*

1.1. Situación taxonómica

1.2. Especies

1.3. Características morfológicas, estructurales, antigénicas y fisiológicas

1.4. Hábitat natural y papel en patología de la *Leptospira*

1.5. Métodos de cultivo y aislamiento

2. LEPTOSPIROSIS EN BOVINOS

2.1 Historia

2.2 Distribución

2.3. Patogenia

2.4 Epidemiología

2.5 Signos clínicos

2.6 Diagnóstico

2.7 Tratamiento

2.8 Prevención y control

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de muestreo

3.2 Toma y procesamiento de muestras

3.3 Selección y procedencia de las cepas de *Leptospira spp.*

3.4 Técnica de Microagutinación (MAT)

3.5 Análisis de datos

IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN
	4.1 Cultivo y multiplicación de las cepas a usar
	4.2 Ensayos en la prueba de Microaglutinación
	4.3 Seroprevalencia
	4.4 Riesgo de infección
V.	CONCLUSIONES
VI.	RECOMENDACIONES
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

RESUMEN

La leptospirosis, causada por diversos serovares de *L. interrogans*, es una enfermedad de amplia distribución geográfica, que afecta tanto a animales como al ser humano y es responsable de elevadas pérdidas económicas en el sector lechero bovino, debido principalmente a abortos e infecciones subclínicas. Con el fin de conocer la seroprevalencia y riesgo de infección a esta enfermedad se tomaron muestras de la totalidad de animales de dos establos, uno en la costa y otro en la sierra. Se obtuvieron 88 muestras de sangre en el establo de la F.M.V-U.N.M.S.M. en Lima y 163 muestras en la Estación experimental I.V.I.T.A. Huancayo, que fueron examinados mediante la prueba de micro aglutinación en campo oscuro (MAT) a fin de detectar anticuerpos frente a los serovares *canicola*, *pomona*, *icterohaemorrhagiae* y *hardjo* de *Leptospira*. En el establo de Lima se determinó una seroprevalencia de 14.7 %, siendo el serovar *icterohaemorrhagiae* el único detectado y en Huancayo la seroprevalencia fue de 12.27 %, detectándose los serovares *icterohaemorrhagiae* y *hardjo*. En ninguno de los animales evaluados se detectó el serovar *pomona* ni *canicola*. El riesgo de infección calculado fue de 1.24 (OR), indicando que por cada animal infectado en Huancayo existe el riesgo de que se infecten 1.24 animales en Lima, sugiriendo un ligero mayor riesgo de infección en el establo de Lima, comparado al de Huancayo.

Palabras clave: bovino, leptospirosis, seroprevalencia, riesgo de infección

ABSTRACT

Leptospirosis, caused by different serovars of *L. interrogans*, is a broad geographical distribution disease, which affects animals as well as humans and is responsible for high economic losses in dairy cattle, mainly due to abortions and subclinical infections. To analyse the prevalence and risk of infection to the disease, samples were taken from the animals of two farms, one on the coast and other in the Andes. We obtained 88 samples of blood of the FMV-UNMSM farm's in Lima and 163 samples of the Experimental Station IVITA Huancayo, which were analyzed by the micro agglutination test (MAT) to detect antibodies anti *Leptospira* of the canicola, pomona, icterohaemorrhagiae and hardjo serovars. In the farm of Lima found a seroprevalence rate of 14,77%, being *L. icterohaemorrhagiae* the only serovar detected while in Huancayo seroprevalence was 12.27%, showing the serovars *icterohaemorrhagiae* and *hardjo*. None of the animals tested were detected serovars *pomona* or *canicola*. The risk of infection calculated was 1,24 (OR), indicating that for every infected animal in Huancayo there is a risk that infected animals in Lima 1.24, suggesting a slightly higher risk of infection in the farm of Lima, compared to Huancayo.

Key words: bovine, leptospirosis, seroprevalence, risk of infection

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Distribución de bovinos según lugar y reacción a la prueba de MAT para la detección de anticuerpos anti-leptospira. 2005.

TABLA 2. Distribución de bovinos reactivos a leptospirosis, según procedencia y título de anticuerpos, detectados mediante la prueba de MAT. 2005.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Microscopia electrónica de *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*

FIGURA 2. Esquema de la estructura de leptospirosis

FIGURA 3. Factores de riesgo asociados a la transmisión de leptospirosis

FIGURA 4. Tipificación molecular de *Leptospira*

I. INTRODUCCIÓN

La ganadería lechera bovina es una actividad económica creciente en las cuencas de Lima y Huancayo, ambas representan una parte importante en la producción lechera y población bovina nacional. Sin embargo, algunas enfermedades infecciosas que cursan principalmente con infecciones subclínicas, como la *Leptospirosis*, afectan la eficiencia y rentabilidad de esta actividad al ser causa de pérdidas económicas debido primordialmente a fallos reproductivos (INEI, 1994; Radostits, 2002)

Esta enfermedad es causada por más de 200 serovares de *L. interrogans* que se hallan ampliamente distribuidos en todo el mundo. Los animales domésticos más afectados son los perros, bovinos y cerdos, variando la sintomatología desde cuadros agudos con ictericia, petequias, anemia hemolítica y muerte, hasta casos que son aparentemente asintomáticos, apreciándose en la mayoría de ellos fiebre ligera, aborto y descenso en la producción. Luego de la infección, especialmente con un serovar adaptado al hospedador, se presenta el cuadro crónico de la enfermedad, en el que las leptospiras pueden alojarse en los túbulos renales siendo eliminados en la orina por periodos de tiempo variables. (Brock, 1993; Radostits, 2002; Acha y Cifres, 1986; Jubb, 1985)

Debido a lo difícil y variable del aislamiento microbiano muchas veces el análisis del suero es la única herramienta para confirmar la infección o detectarla en los casos crónicos. (Radostits, 2002; Koneman *et al.*, 1999; Cole *et al.*, 1973; Brooks *et al.*, 1998)

La leptospirosis es una importante zoonosis endémica y reemergente, su presentación en el hombre se relaciona a cambios climáticos, aumento en las precipitaciones, desplazamientos poblacionales y algunas actividades de riesgo que permiten el contacto directo con ambientes contaminados principalmente con la orina de los animales reservorios. (Ko *et al.*, 1999; OPS/OMS, 2001)

En el presente estudio se determinó la seroprevalencia de leptospirosis bovina de una localidad de la costa y otra de la sierra del Perú y estableció el riesgo de infección asociado a la localidad utilizando la técnica de micro aglutinación (MAT).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. EL GÉNERO *Leptospira*

1.1. Situación taxonómica

Según el “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (Noel y Holt, 2001), la clasificación que tiene el género *Leptospira* es la siguiente:

Phylum X: Spirochetes

Clase I: Spirochaetes

Orden I: Spirochaetales

Familia III: Leptospiraceae

Género: **Leptospira**

Leptonema

Esta clasificación se basa en su hábitat, patogenicidad y características tanto fisiológicas como morfológicas, siendo la mayoría resistentes a la rifampicina. Sus relaciones filogenéticas sobre la base de los RNAs 16S los incluyen dentro de un grupo, aunque se relacionen laxamente. El % G-C es de 35-53 y poseen más de un cromosoma (Brock, 1993; Madigan et al, 2004). Otras espiroquetas de importancia médica comprenden *Borrelia recurrentis*, *Borrelia burgdorferi* y *Treponema pallidum* que son causantes de la Borreliosis, Enfermedad de Lyme y Sífilis, respectivamente (Brock, 1993; Madigan et al., 2004).

1.2. Especies

El género *Leptospira*, que debe su nombre a la forma fina (lepto) y espiralada (spira) de los microorganismos que la integran (Fig 1), incluye a 12 especies, siendo las más importantes *L. interrogans* y *L. biflexa*; la primera es parásita de animales y humanos,

la segunda vive libremente en ambientes acuáticos (Broocks *et al.*, 1998; Radostits, 2002). Ambas especies se diferencian por el crecimiento a 13° C y en un medio con azoguanina que sólo posee *L. biflexa* (Brock, 1993; Kmety y Dikken, 1993; Levett, 2001).

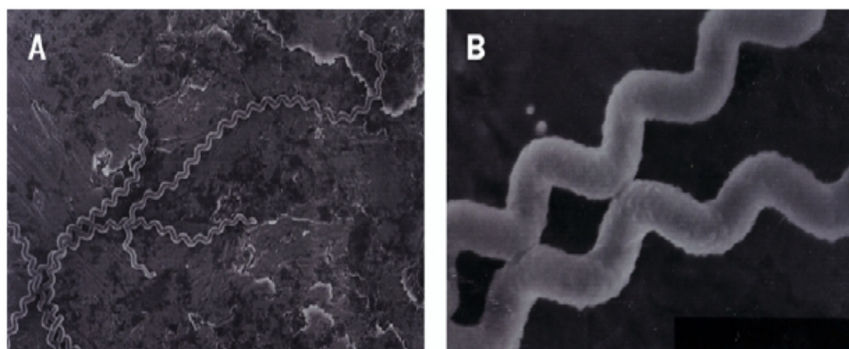


Figura 1. Microscopia electrónica de *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni* con su característica forma espiralada terminada en ganchos. (Tomado de Madigan *et al.* 1984)

La *L. interrogans* incluye a diferentes cepas que se distinguen serológicamente por pruebas de aglutinación cruzada, en más de 200 serovariedades (serotipos) distribuidas en 23 serogrupos (Radostits, 2002; Brock, 1993). Estas serovariedades se deben a la heterogeneidad estructural en la composición de los carbohidratos que componen sus lipopolisacáridos (Nascimento *et al.*, 2004). Muchas de estas serovariedades están adaptadas a hospedadores mamíferos específicos que actúan como reservorios al alojarse en sus túbulos renales y ser excretados en la orina (Nascimento *et al.*, 2004). Recientemente, estudios de homología de DNA han conducido a la reclasificación de los *L. interrogans* en siete especies patógenas: *L. Borgpetersenii*, *L. Inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchi*, *L. santarosai* y *L. weilii* (Goldstein y Charon, 1988; Ramadass *et al.*, 1992; Yasuda *et al.*, 1987)

En nuestro país, Liceras y Sulzer (1984) aislaron e identificaron seis nuevos serovares pertenecientes a 6 serogrupos, en 2 especies de comadreas de nuestra Amazonía.

1.3. Características morfológicas, estructurales, antigénicas y fisiológicas

Las leptospiiras son organismos que miden 6-20 x 0.1 μm y atraviesan filtros de 0.45 μm ; aunque tiñen pobremente son considerados como gram negativos y por eso sólo son visualizados en microscopios de campo oscuro o de contraste de fase; se impregnan bien con plata y colorean con el rojo congo y la tinta china . (Brock, 1993; Brooks *et al.*, 1998; Thiermann, 1984; Koneman *et al.*, 1999)

Las Leptospiras son delgadas, largas, flexuosas y de forma helicoidal; muy enortijada, con los extremos doblados o en ganchos (Fig 1). Estos ganchos son característicos de este género dentro de las Espiroquetas (Lin *et al.*, 1997; Brock, 1993; Brooks *et al.*, 1998).

Poseen dos fibrillas o filamentos axiales que están unidos a los polos del “cilindro protoplásmico” y enredados alrededor de éste. Este cilindro protoplasmático está formado de regiones cubiertas de membrana citoplasmática y de pared celular, constituyendo la porción principal de la célula. Tanto las fibrillas como el cilindro están rodeados por una membrana de tres capas llamada “cubierta externa” (Brock, 1993; Brooks *et al.*, 1998). La composición de fibrillas axiales es similar a la de los flagelos bacterianos con dos clases de proteínas llamadas FlaA y FlaB; esta última, posee una región central variable, que podría estar relacionada a una respuesta inmune especie-específica por parte del hospedador infectado mientras que las otras regiones tienen un papel estructural (Lin, et al, 1997; Goldstein y Charon, 1988). La columna de cada fibrilla se compone de un núcleo rodeado por una cubierta de la fibrilla axial y se sitúa en el espacio periplásmico entre la membrana citoplasmática y la envoltura externa (Fig 2). Estas fibrillas le otorgan motilidad a la célula, cada una de ellas esta anclada en un extremo y se extienden por casi dos tercios de la longitud celular. Las características morfológicas distintivas tales como la forma helicoidal cilíndrica delgada y las fibrillas permiten a las leptospiiras invadir en los tejidos del hospedador (Lin, 1997; Brock, 1993; Brooks *et al.*, 1998).

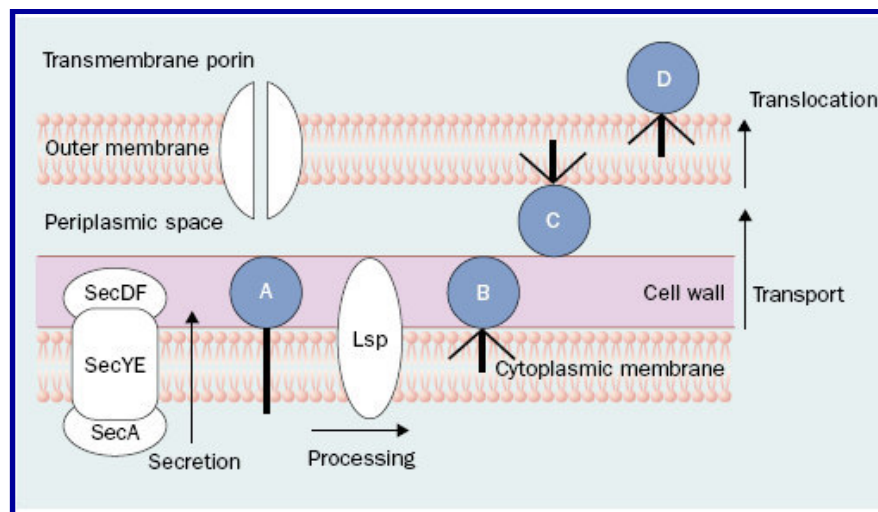


Figura 2. Esquema de la estructura de leptospira. Se nota la pared celular, el espacio periplásmico y la membrana externa. A: propolipoproteína; B y C: lipoproteínas internas; D: lipoproteína de superficie externa. (Tomado de Midwinter *et al.*, 1994)

Las leptospiras patógenas expresan diversas proteínas antigénicas que juegan un rol importante en la respuesta inmune del hospedador al ser dirigidas contra ellas anticuerpos específicos que además de estimular la liberación de diversas citoquinas modulan la respuesta inmune (Okuda *et al.*, 2005; Midwinter *et al.*, 1994).

Algunos antígenos, inducidos específicamente durante el crecimiento in vivo pero no expresados en cultivos, pueden desempeñar un papel importante en estimular respuestas protectoras (Artiushin *et al.*, 2004). Por otra parte, resultados recientes indican que la eficacia vacunal podría estar relacionada con antígenos todavía desconocidos con capacidad de inducir una respuesta del tipo Th1 (Artiushin *et al.*, 2004). Por ejemplo, la proteína Lk73.5 es una esfingomielinasa inducida en el hospedador que no es detectable en leptospiras cultivadas a 37 o 30 °C, sin embargo, su recombinante reacciona fuertemente con el suero de animales recientemente infectados, mas no con el suero de animales vacunados. Por estas características podría ser evaluada para distinguir entre una respuesta vacunal y otra producto de una infección natural (Artiushin *et al.*, 2004).

Cambios en los genes implicados en la biosíntesis de los LPS explicarían la diversidad de serovares entre leptospiros patógenos. Se piensa que esta flexibilidad en la biosíntesis de los LPS, podría ser un mecanismo de adaptación a la nueva especie animal anfitriona que infecta (Nascimento *et al.*, 2004).

Las leptospiros mueren rápidamente en un medio de pH ácido, como la orina de los carnívoros, por esta razón, la orina del hombre y de algunos roedores no es una buena fuente de infección, a no ser que se diluya en agua (Van der Hoeden, 1958). Por el contrario, la orina de los bovinos, cerdos y equinos, al tener un pH alcalino, es considerada como una excelente fuente de infección, ya que favorece la supervivencia de las leptospiros por períodos más prolongados (Gillespie y Ryno, 1963).

Además, la orina de muchos animales presenta aglutininas y lisinas específicas, cuya presencia causa una disminución en el tiempo de vida y el número de microorganismos (Ellis, 1994).

Las *Leptospiras* son microorganismos aerobios estrictos y catalasa positivos; son sensibles al fenol al 5 %, alcohol al 70 %, formol al 2% y ácido clorhídrico 2%, solución hipertónica de sal común (2,8%), bilis, putrefacción y a la mayoría de los antibióticos in Vitro o in vivo. Sin embargo, es resistente al ácido nalidíxico y no incorpora el 5-fluoracilo (Brock, 1993; Brooks *et al.*, 1998; Thiermann, 1984; Koneman *et al.*, 1999)

Las leptospiros utilizan la beta oxidación de los ácidos grasos de cadena larga (ácido oleico, por ejemplo) como fuente de carbono y donador de electrones; metabolizan el glicerol, el que, al igual que los ácidos grasos, obtiene de la degradación de fosfolípidos (Nascimento *et al.*, 2004; Brock, 1993). Bajo condiciones de laboratorio la leptospira no utiliza la glucosa, pese a poseer la vía metabólica completa para su utilización en su genoma (Nascimento *et al.*, 2004). La vía de generación de ATP es de similar organización a la de las eubacterias pero diferente de la de *Borrelia* y *Treponema* (Nascimento *et al.*, 2004). Posee un sistema citocromo peroxidasa que reduce el peróxido de hidrógeno a agua pero sin la necesidad de formar radicales libres inestables. Probablemente a través de esta

vía, pueda utilizar el peróxido de hidrógeno como un aceptor final alternativo de poder reductor para la respiración (Nascimento et al., 2004).

Aproximadamente el 41% del total de proteínas predichas tienen por lo menos un segmento trans membrana, una cantidad similar a las predichas para *T. pallidum* y *B. burgdorferi*; un 9 % de los genes que codifican proteínas posee 4 o más segmentos trans membrana que tendrían funciones relacionadas a transporte (Nascimento et al., 2004).

La *L. interrogans* posee sistemas para reparar el daño que sufre debido a la acción de la luz ultra violeta durante su fase de vida libre en el medio ambiente, mas, para recuperarse del daño oxidativo que sufre en sus bases no cuenta con los principales y más importantes sistemas de reparación de ADN ni con la superóxido dismutasa (Nascimento et al., 2004) .

La *Leptospira spp.* y otras espiroquetas responden a cambios de temperatura aumentando la expresión de diversas proteínas de shock térmico (Hsps) como la GroEl y DnaK. Estas proteínas podrían ser importantes en la patología por *Leptospira interrogans* al protegerla contra la elevada temperatura (fiebre) inducida durante su infección. Por otra parte, *T. pallidum*, aparentemente, no expresa de forma adecuada sus Hsps. Así, la elevación de la temperatura en pacientes con sífilis funcionaba como terapia antes del conocimiento de los antibióticos (Stamm et al., 1991).

1.4. Hábitat natural y papel en patología de *Leptospira*

Leptospira interrogans se encuentra diseminada en ambientes acuáticos y el cuerpo de animales. Los hospedadores naturales de la mayoría de cepas son los roedores, aunque los perros y cerdos también son importantes portadores de ciertas cepas (Brock, 1993; Koneman et al., 1999; Acha y Szyfres, 1986). Infecta a un amplio número de mamíferos siendo los animales silvestres importantes en el mantenimiento de la enfermedad (Gatti et al., 2004). En las ciudades, los serovares de *L. interrogans* que colonizan a poblaciones de

la rata marrón (*Rattus norvegicus*) son la principal causa de infección en humanos (Nascimento *et al.*, 2004).

1.5. Métodos de cultivo y aislamiento:

Las muestras de orina o sangre se pueden colectar en medios de transporte como el Stuart y se cultivan en condiciones aerobias y a oscuras, principalmente en medios líquidos como el Tween 80 con albúmina (para aislamiento), Khorthof (en combinación con fosfomicina y 5-fluorouracilo) y el EMJH (más apropiado para el desarrollo de la MAT) o semisólidos como Fletcher (adecuado para mantenimiento de cepas), enriquecidos con suero de conejo, a pH (7.2-7.6) y a una temperatura que oscila entre los 18 y 28 °C (Brooks *et al.*, 1998; Koneman *et al.*, 1999; Oie *et al.*, 1986). La adición de piruvato de sodio favorece la multiplicación de los serovares de difícil crecimiento (como *L. hardjo* o *L. ballum*) y cuando se cuenta con pocas células en un cultivo inicial (Jhonson *et al.*, 1973; Gonzáles *et al.*, 2006). Cuando se inoculan leptospiros en la superficie de un medio semisólido, éstas crecen formando colonias características bajo la superficie del agar y aunque para algunos serovares no existe variación en la virulencia o morfología de las colonias, para otros, como *L. icterohaemorrhagiae* y *L. pomona*, se ha reportado cambios al crecer superficialmente mas no en su identificación serológica (Wood *et al.*, 1981).

Otra técnica sensible es la inoculación intraperitoneal de plasma fresco u orina a cobayos jóvenes, demostrándose luego de unos días, la presencia del microorganismo en la cavidad abdominal. Luego de la muerte del animal, que ocurre entre 8-14 días, se observan lesiones hemorrágicas en muchos órganos (Brooks *et al.*, 1998). También crecen en las membranas corioalantoideas de huevos embrionados (Brooks *et al.*, 1998).

Para el aislamiento de *Leptospira spp.* de muestras ambientales, se procede a tomar el agua superficial en frascos estériles que luego se centrifugan y siembran en los medios anteriormente señalados (Gatti, 2004).

2. LEPTOSPIROSIS EN BOVINOS

2.1 Historia

La leptospirosis fue descrita por primera vez en el año 1886 entre trabajadores agrícolas por el médico alemán Adolf Weil quien la llamo “ictericia hemorrágica”. Esta enfermedad también es conocida con otras denominaciones como fiebre de los arrozales, enfermedad de las henificadoras, fiebre de los pantanos y fiebre de cieno, entre otras (Van der Hoeden, 1958; Koneman et al, 1999; Acha y Szyfres, 1986).

Las primeras informaciones sobre la leptospirosis animal datan de 1852 en que Hofer llamó Tyfus Seu Febris Nervosa Canum a una enfermedad de los perros antes desconocida. En 1898 Keff la renombró como la enfermedad de los perros de Stuttgart (Stuttgarte Handesenchue). En 1922 el checoslovaco Lukes aclaró la etiología de esta enfermedad al demostrar que el agente causante era una espiroqueta. Sin embargo, la primera descripción de las *Leptospiras* como agentes productores de enfermedad en los animales se realizó en 1933, cuando Klarenbeck y Schuffner demostraron que la *L. canicola* era el agente etiológico de la enfermedad Stuttgart en los perros (Van der Hoeden, 1958). El año de 1935 Michin y Azinov fueron los primeros en notificar la afectación de leptospirosis bovina en la antigua URSS, llamándola “hemoglobulinuria infecciosa aguda” y al agente aislado *L. icterohaemorrhagiae* bovina (que luego se atribuiría a *L. grippotyphosa*).

La primera notificación de leptospirosis en el continente americano se atribuye a Jungherr (1944) quien la notificó en bovinos de los Estados Unidos de América. Luego, Smith y Perry (1952) divulgaron los primeros casos en Canadá.

2.2 Distribución

Es mundial, siendo más común en los países tropicales y subtropicales con climas templados y húmedos donde se dan las facilidades para su transmisión. Las condiciones

como precipitación, temperatura, humedad relativa así como el pH, estructura y la composición de suelo hacen más favorable su presentación (Artiushin *et al.*, 2004; Acha y Szyfres, 1986).

2.3 Patogenie

La transmisión ocurre a través del contacto con agua, suelo y alimentos contaminados con orina, fetos abortados y secreciones uterinas de una fuente de infección que es un animal doméstico o silvestre infectado. La transmisión a través de semen contaminado es infrecuente (Radostits, 2002).

Los principales mecanismos de virulencia de *L. interrogans* se relacionan a su motilidad y quimiotaxis que le permiten invadir los tejidos del hospedador durante la infección. Los genes que codifican estos mecanismos de virulencia son al menos 79 y están bien conservados entre las diversas espiroquetas (*L. interrogans*, *B. borgderferi* y *T. pallidum*) teniendo al menos 42 genes en común. Este amplio número de genes asociados a motilidad y su expresión diferenciada o no, puede ser que reflejen la supervivencia y adaptación de leptospiros patógenas a una variedad de ambientes y hospedadores diferentes (Nascimento *et al.*, 2004).

Las leptospiros ingresan al cuerpo por las membranas mucosas o por lesiones en la piel, siendo poco frecuente la transmisión transplacentaria o intrauterina. La *Leptospira interrogans* es capaz de unirse a células epiteliales y adherirse a los constituyentes de la matriz extracelular por procesos que afectan las proteínas de su superficie (Radostits, 2002).

La diseminación de las leptospiros a diversos órganos, vía sanguínea principalmente, podría deberse a una rápida translocación a través de monocapas de células del hospedador. Además de su capacidad de movilidad y quimiotaxis, pueden invadir diversos tejidos debido a la secreción de enzimas con capacidad de degradar las membranas de las células hospedadoras como esfingomielinasas, fosfolipasas y hemolisinas. La

degradación de las proteínas de la matriz extracelular por collagenasas, metaloproteasas y termolisinas facilita la invasión tisular. Un gran número de estas enzimas son transportadas a la superficie bacteriana como lipoproteínas por sistemas de transporte de tipo I y/o II (Nascimento *et al.*, 2004; Ellis, 1994).

Después de una multiplicación en diversos órganos, principalmente hígado, se localiza en riñón e hígado, causando nefritis e ictericia. El organismo sale por la orina siendo ésta la fuente de infección común (Brock, 1993; Acha y Szyfres, 1986).

El endotelio vascular es un sitio importante de la patología durante la infección leptospiral y la resultante lesión de los vasos sanguíneos es responsable de las hemorragias características encontradas en la fase aguda de la enfermedad. El mecanismo de la acción de la proteína Lk73.5 por ejemplo, puede implicar la degradación enzimática de los componentes de la membrana o formación de poros en ella, como ha sido descrito en el caso de la proteína SphH de *L. interrogans* serovar *lai*. Es posible que el daño vascular típico requiera el efecto cooperativo de otras esfingomielinasas (Artiushin *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2002).

La pérdida de la superóxido dismutasa podría aumentar la susceptibilidad de las leptospiras a la explosión oxidativa generada por los macrófagos durante la infección, aunque, una metaloporfirina con actividad parecida a la SOD podría atenuar esta susceptibilidad (Nascimento *et al.*, 2004).

Dos genes que proveerían una defensa adicional contra el stress oxidativo, encontrados en *L. interrogans*, codifican proteínas que tienen un dominio von Willebrand tipo A. Este dominio estaría envuelto en la falla de la hemostasis durante la infección por *L. interrogans*, aunque aún de manera no muy bien comprendida (Nascimento *et al.*, 2004).

Para la colonización de tejidos, importante en el establecimiento de la enfermedad, la *Leptospira* cuenta con al menos dos familias de adhesinas no fimbriales que contribuyen en los pasos iniciales de la infección y estarían envueltas en la interacción hospedador-

patógeno. Las diferencias en los genes que codifican estas adhesinas reflejarían la adaptación a distintos reservorios como *Rattus norvegicus* y *Apodemus agrarius* (en los serovares *copenhageni* y *lai* respectivamente). Por lo tanto, los mecanismos de adaptación a un hospedador probablemente incluyan modificaciones en los liposacáridos de superficie (Nascimento *et al.*, 2004).

La *Leptospira interrogans* posee genes relacionados a la biosíntesis y secreción de polisacáridos y exopolisacáridos capsulares (que se ligan covalentemente a la pared celular), aunque no hay evidencia experimental que produzcan una cápsula o formen un biofilm; estos genes podrían ayudar a comprender el mecanismo de colonización leptospiral del epitelio tubular renal con la formación del biofilm (Nascimento *et al.*, 2004).

Los polisacáridos y exopolisacáridos de la superficie capsular podrían también ser importantes en la supervivencia de las leptospirosis patógenas fuera del anfitrión, al protegerlas de tensiones hídricas y osmóticas del medio ambiente (Nascimento *et al.*, 2004).

La persistencia renal (así como en la cámara anterior del ojo, placenta y meninges donde el sistema inmune no es capaz de eliminarlo) se ve favorecido por la producción de ureasa. Las leptospirosis se multiplican en los túbulos renales, cerca de las microvellosidades, aquí el daño a los capilares, la liberación de hemolisinas y diversas endotoxinas, además de una respuesta auto inmune mediada por mononucleares infiltrados, causa nefritis y anoxia (Timoney, 1988).

El aborto generalmente se debe a la acción degenerativa local de la placenta, alterando el delicado intercambio fisiológico madre-feto, y a la acción de las hemolisinas que atacan a los glóbulos rojos del feto, causándole directamente la muerte (Jubb, 1985; Gásquez Ortiz, 1991).

Los anticuerpos IgM, que son los primariamente envueltos en la aglutinación de *Leptospiras*, se pueden detectar desde el segundo día después del inicio de síntomas y

pueden persistir por períodos prolongados de tiempo, mientras que los anticuerpos IgG son perceptibles desde el séptimo día de la enfermedad, aunque usualmente en bajos niveles. Los anticuerpos específicos, sumados a la acción del complemento y la lizosima, desaparecen efectivamente las leptospiras de la sangre (Bajani *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 1995; Timoney *et al.*, 1988). El pico de las IgM e IgG se alcanza a las 3-4 semanas y 4-12 semanas de la infección, respectivamente. La aparición de las IgA en la orina de animales suele darse a las 12 semanas de la infección (Leonard *et al.*, 1993).

En los humanos, a diferencia de los animales, la respuesta de anticuerpos a leptospirosis parece no seguir el patrón clásico de IgM a IgG, hallándose una prolongada persistencia de IgM y diferente habilidad individual para producir IgG (Lupidi *et al.*, 1991).

2.4 Epidemiología

La principal fuente de infección es la orina, incluso la de los animales recuperados de la fase clínica de la enfermedad, ya que se eliminan leptospiras por un período de tiempo prolongado, que varía entre los 10 y 118 días en los bovinos. La persistencia en los riñones es mayor al período del que se pueden recuperar de la orina (Radostits, 2002; Acha y Szyfres, 1986).

Los terneros y corderos, que como una forma de pica beben orina, son muy susceptibles a la infección siendo muy probable que se produzca septicemia en ellos. Los animales silvestres constituyen una fuente dudosa de infección, al reportarse niveles variables de seroprevalencia, llegando a transmitirse la infección de perros a chacales, y aun de seres humanos al ganado bovino en condiciones sanitarias deficientes. Los principales factores de riesgo del animal dependen de la serovariedad infectante y de su susceptibilidad a la enfermedad. Los animales adaptados a una serovariedad se comportan como hospedadores reservorios, mientras los no adaptados actúan como hospedadores accidentales cuando se infectan con ésta (Radostits, 2002).

Un hospedador reservorio es el que va a permitir el mantenimiento de una especie de leptospira en un ecosistema determinado, al tener gran receptividad a la infección por esta. Además, en el hospedador, el microorganismo es poco patógeno y la infección tiende a ser crónica (manteniéndose en el tracto uro-genital de algunos hospedadores), hay presencia de infección renal con leptospiruria prolongada y se transmite eficazmente a los animales de la misma especie por contacto directo (Prescott, 1993; Thiermann, 1984; Radostits, 2002).

En un hospedador accidental, la infección se caracteriza por presentarse principalmente en la forma aguda grave, con una respuesta alta en título de anticuerpos, el período de la leptospiruria es más bien corto y la transmisión intraespecie es esporádica (Prescott, 1993; Thiermann, 1984; Radostits, 2002).

La transmisión de la infección entre hospedadores de mantenimiento se realiza independientemente de las condiciones climáticas y ambientales, no obstante, para la transmisión de un hospedador de mantenimiento a un accidental o entre accidentales se hace necesaria la supervivencia del agente en el medio ambiente (Radostits, 2002; Thiermann, 1984; Prescott, 1993).

La mayoría de los casos son subclínicos siendo la infección más común que el cuadro clínico. La infección por la serovariedad *pomona* es la más común en todos los animales de granja pero su distribución mundial es impredecible. Otras serovariedades descritas como causantes de infección en ganado bovino son *L. canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *grippotyphosa*, *sejroe*, *hebdomadis* y *australis* (Radostits, 2002; Acha y Szyfres, 1986). En climas templados dos de las serovariedades más comúnmente asociadas con enfermedad son *L. interrogans* serovar *pomona* y *L. borgpetersenii* serovar *hardjobovis*, de las que son reservorios cerdos y ganado bovino, respectivamente (Lee *et al.*, 2002).

El índice de morbilidad de la enfermedad clínica varía entre 10-30% siendo el de mortalidad de aproximadamente 5%. El porcentaje de abortos puede llegar hasta el 30% y la mortalidad en terneros puede llegar a ser importante (Radostits, 2002).

La repercusión económica más importante en la explotación bovina son los problemas reproductivos, que son una secuela crónica de la enfermedad en las reproductoras, causando mortinatos, abortos o nacimientos de animales débiles disminuyendo la fertilidad (Ellis, 1994). También puede ser considerada importante la pérdida económica asociada al “Síndrome de caída de la leche” o agalactia producida por estos microorganismos (Ellis, 1983). A estas pérdidas, habría que añadir las originadas por desecho temprano y por aumento en la tasa de eliminación de animales por causas reproductivas. Todas estas pérdidas son difíciles de estimar debido a lo difícil del diagnóstico.

La *L. hardjo* es la serovariedad adaptada a los bovinos, que actúan como hospedadores de mantenimiento, siendo causa importante de aborto en ellos. *L. hardjo* se elimina hasta por ocho días luego del parto o aborto pudiendo detectársele en útero y oviductos hasta por 90 días (Radostits, 2002).

Los niveles de seroprevalencia varían de acuerdo a la zona geográfica y la serovariedad en estudio, así, existen reportes de entre 34 y 65 % en EE.UU. (con un 30 % positivos a *L. hardjo*) y entre 25 y 65 % en Europa, Australia y América del Sur (también a *L. hardjo*). *Hardjo-bovis*, es la serovariedad más común en Reino Unido, Australia, Nueva Zelanda y EE.UU. En Canadá, *hardjo-bovis* resultó ser la más común en ganado de carne y *pomona* en el ganado lechero (Prescott *et al.*, 1988). *L. pomona*, por lo común se encuentra en establos determinados ya que los bovinos no actúan como portadores a largo plazo, hecho que si ocurre con *L. hardjo* en que la prevalencia tiende a aumentar y extenderse por toda una localidad (Radostits, 2002). *L. hardjo* ha sido asociado a infertilidad, y se le ha podido hallar en casi el 40% de fetos bovinos abortados en Irlanda del Norte (Ellis *et al.*, 1981). Reportes en Colombia y Venezuela encontraron una seroprevalencia de 60.9% y 41.75%, respectivamente (Ochoa *et al.*, 2001; Godoy *et al.*, 1997). Por otra parte en Brasil,

que cuenta con un clima húmedo y tropical, se obtuvieron prevalencias por encima del 45% (Langoni *et al.*, 2002; Nilson, 2003)

Entre los principales agentes etiológicos asignados como responsables de aborto bovino destaca *L. hardjo*, sin embargo, el papel que cumple es difícil de elucidar ya que también se le puede hallar en fetos bovinos saludable. Es necesario considerar que aproximadamente sólo en el 40% de los fetos remitidos a laboratorios se puede llegar a hacer un diagnóstico correcto, no llegando a identificarse una causa en el resto (Prescott *et al.*, 1988; Rivera, 2001).

Es de destacar que se han detectado anticuerpos contra leptospiras en 19 de los 25 departamentos de nuestro país, tanto en humanos como en animales, identificándose como factores de riesgo algunas actividades como la minería y el cultivo de arroz, el consumo de agua de río, las precipitaciones pluviales, el contacto con roedores y animales domésticos, la falta de condiciones sanitarias (inadecuada eliminación de excretas), algunas características de la casa como el piso de suelo y el contacto con suelos y aguas contaminadas, entre otros (Liceras *et al.*, 1981; Liceras *et al.*, 1989; Céspedes *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2002). (Fig 3)



Figura 3. Factores de riesgo asociados a la transmisión de la leptispirosis. A: Caminar descalzo en la selva. B: Fuentes de agua estancada que se usan para nadar. C: Deficiente fuente de agua potable para consumo. D: Mujeres lavando ropa en aguas estancadas. (Tomado de Liceras et al. 1989)

En el estudio llevado por Ochoa *et al.* (2001), en una zona altoandina de Colombia, se pudo identificar como un factor de riesgo adicional, para la infección bovina, el uso del estiércol porcino como abono de los pastizales que usaban las vacas lecheras. Aquí se pudo hallar una alta prevalencia para los serovares *pomona* y *hardjo*.

Finalmente, la tasa de aislamiento parece que se relaciona más con la temperatura que con el nivel de precipitación, siendo esto un indicativo que no se necesita un nivel elevado de lluvias para la transmisión de la enfermedad (Radostits, 2002)

2.5 Signos clínicos

Los signos se dan luego de un periodo de incubación que oscila entre los 3 y 7 días y varían en grado de acuerdo a si la enfermedad es de curso agudo, subagudo o crónico. Los signos no tienen mayor variación respecto de la especie infectante, salvo *icterohaemorrhagiae* que normalmente cursa con septicemia grave (Radostits, 2002).

Los principales signos en terneros son anorexia, fiebre elevada, petequias, anemia hemolítica aguda con hemoglobinuria, ictericia, mucosas pálidas y apatía. En los adultos se aprecia principalmente hemoglobinuria y aborto, con retención de placenta hasta en un 20% de los casos. También se puede apreciar reducción en la producción de leche, que cambia su aspecto y coloración, debido principalmente a la lesión vascular generalizada, sin cambios físicos apreciables en la ubre. Algunas veces se puede apreciar cojera debido a una sinovitis intensa. (Radostits, 2002)

En muchas ocasiones no se aprecia ningún signo clínico y sólo se reporta como hallazgo títulos aglutinantes positivos en animales sanos (Radostits, 2002). A la necropsia se puede apreciar ictericia en mucosas, palidez hepática, renal y esplénica, petequias y edema en diversos órganos. Todos estos signos son característicos mas no patognomónicos de la enfermedad (Radostits, 2002).

En humanos, la sufusión conjuntival es un signo diagnóstico específico de la enfermedad, aunque su ocurrencia es variable entre brotes. Además, la alteración del estado mental, la oliguria y la edad superior a 36 años son consideradas como las más fuertes predictores de casos fatales, por encima de la elevación de la creatinina sérica, nitrógeno ureico sanguíneo y la insuficiencia respiratoria (Ko *et al.*, 1999; Plank y Dean, 2000)

2.6 Diagnóstico

El diagnóstico se puede realizar por el aislamiento del microorganismo en muestras de orina y sangre del animal afectado pero el tiempo que lleva el cultivo y la identificación hacen que los resultados sólo sirvan para un diagnóstico retrospectivo por esto se usan con frecuencia una combinación de métodos serológicos y genéticos (Adler *et al.*, 1980; Bajani *et al.*, 2003; Victoria *et al.*, 2002). También se realiza la prueba de Inmunohistoquímica para detectar el antígeno directamente en tejido (Bajani *et al.*, 2003).

La prueba estándar de referencia para el diagnóstico de la leptospirosis (y para estudios epidemiológico), según la OIE, es la Microaglutinación (MAT). Estudios le otorgan al MAT una sensibilidad y especificidad de 92 y 95%, respectivamente, con un valor predictivo positivo de 95% y negativo de hasta 100%. Si bien la interpretación es subjetiva, no siempre se detecta las infecciones, especialmente las producidas por serovares poco antigénicos como *L. hardjo*, y no discrimina entre anticuerpos vacunales de los producidos por una infección natural, la prueba permite procesar un gran número de muestras en poco tiempo. (Cole *et al.*, 1973; Hickey, 2002; Ellis *et al.*, 1981; Thiermann, 1984; Heath y Jhonson, 1994).

En esta prueba se usa microorganismos vivos como antígenos y debido a esto implica cierto riesgo de infección durante su aplicación. El diagnóstico es a través de la elevación del título de anticuerpos en muestras de suero tomadas con un intervalo de dos semanas (Cole *et al.*, 1973; Lilenbaun *et al.*, 2002; Adler *et al.*, 1980; Bajani *et al.*, 2003; Acha y Szyfres, 1986). Sin embargo, siempre es más fácil el diagnóstico de todo el hato que el individual, por la mayor probabilidad de detectar un animal con títulos elevados. (Radostits, 2002)

Se ha reportado que la MAT (y también diferentes ELISA y pruebas como la de Inhibición de la hemoaglutinación) algunas veces tienen reacciones cruzadas con enfermedades como legionelosis, enfermedad de Lyme y sífilis, entre otras (Bajani *et al.*, 2003).

Otras técnicas como la aglutinación rápida en portaobjetos (RSTA), aglutinación en latex (LAT) y diversos ELISA (con proteínas recombinantes como antígenos) también detectan anticuerpos (IgG e Ig M) y son comúnmente empleadas, pero las primeras tienen como inconveniente la evaluación subjetiva de la aglutinación y la dificultad de procesar varias muestras al mismo tiempo, mientras que la segunda al trabajar con bacterias vivas para la preparación del antígeno conlleva un riesgo de infección (Okuda *et al.*, 2005; Adler *et al.*, 1980; Acha y Szyfres, 1986, Ramadas *et al.*, 1999).

La técnica de Inhibición del crecimiento (IC) es una técnica más adecuada que la MAT para el diagnóstico serológico de infecciones crónicas al detectar principalmente IgG, aunque no se usa de rutina (Ochoa *et al.*, 2001; Gallego *et al.*, 1996; Godoy *et al.*, 1997; Tripathy *et al.*, 1972).

Técnicas moleculares como RAE (Análisis por Endonucleasas de Restricción) han sido aplicadas desde la década pasada en el diagnóstico y estudios epidemiológicos de leptospirosis logrando reconocer tipos dentro de serovariedades y relacionándolos con los hospedadores de donde fueron aislados (Bolin y Zuerner, 1996) (Fig.4)

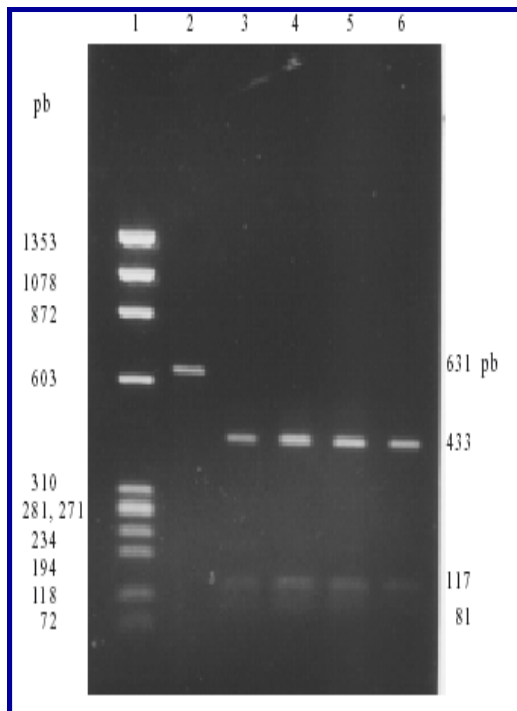


Figura 4. Tipificación molecular de *Leptospira*. Análisis por RFLP-PCR para determinar cepas de *Leptospira spp.* (tomado de Victoria et al., 2002)

2.7 Tratamiento

El tratamiento tiene como objetivo acabar con la infección antes que el daño en hígado y/o riñones sea irreparable. Son efectivos casi todos los antibióticos de uso rutinario como la penicilina, estreptomicina, doxiciclina y tetraciclinas (Radostits, 2002; Thiermann, 1984; Ellis *et al.*, 1985; Acha y Szyfres, 1986; Brock, 1993).

Se recomienda el uso de la estreptomicina vía I.M. a dosis de 25 mg/kg de peso vivo por una vez como tratamiento para eliminar la leptospiuria. Esto se debe a su espectro de acción frente a bacterias Gran negativas, su distribución y eliminación por vía renal y a su mayor efectividad en soluciones ligeramente alcalinas como, por ejemplo, la orina de los herbívoros (Radostits, 2002; Booth y Mc Donald, 1988). Un estudio reportó a la amoxicilina como tratamiento alternativo a la estreptomicina en las infecciones del ganado bovino debidas a *L. hardjo* (Smith *et al.*, 1997)

2.8 Prevención y control

Se utilizan vacunas con cepas virulentas muertas y atenuadas que se incluyen, en la vacunación de caninos, *L. canícola* y *L. icterohaemorrhagiae*. La eliminación de ratas, portadoras de *L. icterohaemorrhagiae*, ayuda considerablemente a impedir que el organismo llegue a otros animales y al hombre (Brock, 1993). Lo recomendable es que las vacunas contengan las serovariedades que afectan a la región geográfica en cuestión (Radostits, 2002; Acha y Szyfres, 1986).

El control por la vacunación es poco efectivo debido a que las vacunas no son eficaces, inducen anticuerpos contra antígenos específicos del serogrupo por lo que poseen un bajo espectro de la protección cruzada y la duración de la inmunidad es corta. Las vacunas de *Leptospira* estimulan generalmente una inmunidad protectora que es inferior a la desarrollada tras la recuperación de un cuadro agudo o subclínico de leptospirosis (Artiushin *et al.*, 2004; Acha y Szyfres, 1986).

El efectivo control se logra evitando la exposición a aguas o alimentos contaminados con las heces y orina de animales activos o portadores asintomáticos. La desinfección de locales y equipos con hipoclorito y los programas de desratización son importantes para evitar la difusión de la enfermedad (Brooks *et al.*, 1998; Radostits, 2002; Acha y Szyfres, 1986).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de muestreo

Las muestras fueron tomadas en una localidad de la sierra central y en otra de la costa. Los animales procedentes de la sierra fueron bovinos de la Estación experimental I.V.I.T.A. Huancayo, que forma parte de lo que se conoce como el “Valle del Mantaro”, estando ubicada en el Departamento de Junín, a una altitud de 3249 m.s.n.m. El sistema de crianza es semi intensivo, consumiendo concentrado al momento de ordeño y pastos mejorados el resto del día. El otro lugar de toma de muestras fue el establo de la F.M.V.-U.N.M.S.M. localizada en el distrito de San Borja, departamento de Lima, ubicada a una altitud de 170 m.s.n.m., donde la crianza se basa en la alimentación con concentrados y el uso de la chala como forraje verde.

Se obtuvo muestras de sangre de la totalidad de bovinos de ambas localidades, 163 animales de Huancayo y 88 de Lima.

3.2 Toma y procesamiento de las muestras

Se punzó con una aguja estéril la vena caudal de los animales, colectándose aproximadamente 7 mL de sangre en tubos vacutainer sin anticoagulante; a continuación se procedió a centrifugar la muestra a 13 000 RPM durante 5 minutos, separándose luego el suero en viales de 2 mL, procediéndose a su inmediata congelación a – 20°C en el Laboratorio de Medicina Veterinaria Preventiva, hasta el momento de su análisis serológica.

3.3 Selección de las cepas de *Leptospira spp.* y procedencia

Según la W.H.O. (1999), en la ejecución de la M.A.T., se deben de usar los serovares más prevalentes en el área o por lo menos una cepa representativa de las especies más frecuentes. Así, se probaron los serovares *icterohaemorrhagiae*, *pomona*, *hardjo* y *canicola* que son las que la literatura reporta como las más frecuentes e importantes en el ganado bovino y se conoce que ocurren en nuestro país. Estas serovariedades ya se encuentran identificadas, provienen del Laboratorio de Virología de la FMV-U.N.M.S.M y se usan rutinariamente en el diagnóstico de Leptospirosis.

Las cepas son mantenidas en medio semisólido Fletcher (DIFCO), de donde se realizo pasajes al medio EMJH (DIFCO) para su rápida multiplicación. Luego de verificar una adecuada motilidad, morfología y concentración microbiana se procedió a su uso en la MAT.

3.4 Técnica de Microaglutinación (MAT)

Fue realizada usando el procedimiento estándar (Cole *et al.*, 1973), con modificaciones menores. La suspensión de los 4 serovares de leptospiras vivas fueron agregadas en una placa de 96 pocillos que contenían diluciones en serie desde 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 hasta 1/1600 del suero problema y que se incubaron para la aglutinación durante 2 horas a 28°C. Se tomaron como control negativo pocillos que contenían el antígeno diluido solamente con suero fisiológico y, como control positivo, sueros con resultado positivos ya titulados con anterioridad. Luego se examinó en el microscopio de campo oscuro a una ampliación del 10 X con ayuda de aceite de inmersión (Carguile), una alícuota de 10 ul de cada uno de los serovares en estudio sobre una lámina porta objetos. El título obtenido fue calculado como el recíproco de la dilución más alta del suero que aglutinó por lo menos el 50% de las bacterias para cada serovar usado. Los serovares incluidos en el panel del antígeno tenían el siguiente orden: *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *pomona* y *hardjo*.

Un animal fue considerado como positivo a un determinado serovar si tenía un título $\geq 1/100$ (Ellis, 1986; Timoney *et al.*, 1988; Heath y Jhonson, 1994; Radostits, 2002, Prescott *et al.*, 1988).

3.5 Análisis de los datos

La prevalencia de leptospirosis fue determinada teniendo en consideración la seropositividad de los sueros a la MAT, siendo expresada en forma porcentual, empleando la siguiente formula (Ahlbom y Norell, 1992):

$$P (\%) = \frac{\text{N}^\circ \text{ de sueros (positivos)}}{\text{N}^\circ \text{ de sueros analizados}} \times 1000$$

Con la finalidad de evaluar la localidad como factor de riesgo se calculó el Odds ratio (Daniel, 2004), teniendo en consideración la positividad de los sueros y la procedencia de los animales.

Factor de Riesgo/ Estado de Infección	Suero +	Suero -	Total
A	a	b	a+b
B	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	n

Donde OR= ad/bc

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Cultivo y multiplicación de las cepas

Se realizó pasajes de las cepas originales mantenidas en el medio semi sólido Fletcher, al medio EMJH, esto con el fin de acelerar el crecimiento microbiano ya que este es el medio más adecuado para el desarrollo de la prueba (MAT).

Durante el proceso se observó que la cepa que demoró más en alcanzar la concentración deseada fue *L. hardjo*; por el contrario, *L. canicola* fue la de mas fácil y rápido crecimiento. De igual modo al hacer pasajes de las cepas patrón a otro medio Fletcher, con el fin de mantener el cepario, se observó lo anteriormente comentado. Esto coincide con lo citado por Johnson *et al.*, (1973) y Gonzales *et al.*, (2006) quienes experimentaron con la adición de algunos nutrientes a medios nutritivos estándar, para lograr un mejor crecimiento de los serovares de difícil multiplicación como *L. ballum* (o *L. hardjo*). Lo que al parecer lograron estos autores seria suministrar una fuente adicional de acetil Co A, que *Leptospira* obtiene principalmente de la β oxidación de los ácidos grasos de cadena larga, que es la vía de entrada al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Gonzales *et al.*, 2006; Nelson y Cox, 2001; Johnson *et al.*, 1973).

También se pudo observar células largas o pleomorfismo y motilidad reducida si el inóculo que se tomaba para realizar los pasajes estaba envejecido. Cuando ocurría esto se tenía que realizar pasajes continuos hasta lograr una biomasa de la calidad requerida para la prueba.

Una observación adicional es el menor tamaño que tiene el serovar *hardjo*, comparado con los otros serovares en estudio, que aparentemente es característico de esta cepa.

4.2 Ensayos en la prueba de Micro aglutinación

Este estudio se basó en el uso de la técnica de micro aglutinación (MAT), prueba considerada como estándar y de rutina para el serodiagnóstico de la leptospirosis. La MAT demostró ser útil para procesar varias muestras al mismo tiempo, obteniéndose los resultados en sólo unas horas en comparación con el tiempo que demora realizar el cultivo que es de al menos una semana (Cole *et al.*, 1977; Hickey, 2002; Thiermann, 1984; Heath y Jhonson, 1994). Si bien la interpretación de prueba es subjetiva (50% o más de aglutinación para considerar como positivo el resultado) con un adecuado entrenamiento se diferencia sin dificultad un suero positivo de uno negativo.

Para verificar la reproducibilidad y destreza en la ejecución de la prueba se sometió al test de micro aglutinación algunos sueros previamente analizados en el laboratorio lográndose los mismos resultados tanto en positividad como en título de anticuerpos.

4.3 Seroprevalencia

Debido a lo difícil y lento del aislamiento del agente causal, la prueba estándar para el diagnóstico serológico es la micro aglutinación (MAT). Esta prueba detecta principalmente IgM pero también IgG, siendo particularmente útil en el diagnóstico de casos clínicos agudos (Radostits, 2002; Cole *et al.*, 1973; Heath e Johnson, 1994).

Los serovares que detectó la prueba de micro aglutinación (MAT) fueron *L. icterohaemorrhagiae* y *L. hardjo*. Aquí es necesario resaltar que la MAT es una prueba más útil para detectar infecciones debidas a un serovar incidental (como *icterohaemorrhagiae*) y las recientes debidas a un serovar adaptado al hospedador como *L. hardjo*. Las infecciones crónicas causadas por serovares de mantenimiento son difíciles de detectar por la MAT, debido al título insignificante que tienen luego de una infección subclínica (Radostits, 2002).

Ambos establos resultaron positivos a leptospirosis, al contar con al menos un animal positivo a la prueba de micro aglutinación (Tabla 1), hecho que era de esperar debido a la amplia distribución de la enfermedad y a las precipitaciones que ocurren (principalmente en Huancayo) y que sirven para el mantenimiento de *Leptospira spp.* (Timoney *et al.*, 1988; Prescott *et al.*, 1988; INEI, 1994).

Ninguno de los animales evaluados mostró evidencia de infección leptospiral con más de un serovar y tampoco reaccionaron a los serovares *pomona* ni *canicola* (Tabla 1).

Como en las zonas de estudio no se aplica vacunación contra la leptospirosis, no existe el riesgo de confundir los títulos de anticuerpos hallados, debido a una infección natural, con otros producto de una inmunización, que la prueba no puede distinguir (Cole *et al.*, 1977; Hickey, 2002).

Al analizarse los bovinos del establo de la FMV - UNMSM con sede en Lima, 13 de las 88 muestras resultaron positivas únicamente al serovar *icterohaemorrhagiae* de *Leptospira*, constituyendo en una prevalencia de 14.77 (Tabla 1).

Por otro lado, en el Establo del I.V.I.T.A. Huancayo, se detectaron 20 animales reactivos de 163, representando una prevalencia de 12.27%, de los cuales 16 (9.82%) resultaron positivas para el serovar *icterohaemorrhagiae* y sólo 4 (2.45%) para el serovar *hardjo* (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de bovinos según lugar y reacción a la prueba de MAT para la detección de anticuerpos anti-leptospira. 2005.

SEROVAR	LUGAR			
	LIMA n = 88		HUANCAYO n = 163	
	Positivos	%	Positivos	%
Icterohaemorrhagiae	13	14.77	16	9.82
Hardjo	0	0.00	4	2.45
Pomona	0	0.00	0	0.00
Canicola	0	0.00	0	0.00
TOTAL	13	14.77	20	12.27

IC_{0.95} [7.36 ≤ Π ≤ 22.18] IC_{0.95} [7.23 ≤ Π ≤ 17.31]

Se observa una seroprevalencia ligeramente superior en el establo de Lima respecto del de Huancayo (14.77 vs. 12.27); sin embargo, esta diferencia es relativamente pequeña.

Ellis *et al* (1986) encontraron títulos \geq a 1/100 para el serovar *hardjo*, dan una excelente especificidad pero son poco sensibles para medir infección, esto significa que la seroprevalencia real en Huancayo podría ser 2 veces más alta que la encontrada para este serovar (Ellis *et al.*, 1986; Prescott *et al.*, 1988).

En relación a los títulos de anticuerpos alcanzados en las muestras de Lima, de las 13 positivas, diez mostraron títulos con valores de 1/100, dos tuvieron valores de 1/200 y sólo una un título de 1/400 (Tabla 2). En Huancayo, del total de las muestras positivas, las 16 muestras que resultaron positivas para el serovar *icterohaemorrhagiae* presentaron título de 1/100 y de las 4 que reaccionaron al serovar *hardjo*, dos de ellas tuvieron título de 1/100 y las otras dos título de 1/200 (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de bovinos reactivos a leptospirosis, según procedencia y título de anticuerpos, detectados mediante la prueba de MAT. 2005.

	SEROVAR	TÍTULO			TOTAL	
		1/100	1/200	1/400	n	%
L I M A	Icterohaemorrhagiae	10	2	1	13	100
	Hardjo	0	0	0	0	0
	Pomona	0	0	0	0	0
	Canicola	0	0	0	0	0
	TOTAL	10	2	1	13	
	%	77	15	8		100
H U A N C A Y O	Icterohaemorrhagiae	16	0	0	16	80
	Hardjo	2	2	0	4	20
	Pomona	0	0	0	0	0
	Canicola	0	0	0	0	0
	TOTAL	18	2	0	20	
	%	90	10	0		100

Los títulos hallados son bajos en ambas localidades, así, de los sueros positivos en Lima el 77% (10/13) tenían título de 1/100, el 15.4% (2/13) título de 1/200 y sólo uno tuvo un título de 1/400 que representaba el 7.6%. Estos resultados podrían corresponder a infecciones recientes cuyos títulos están en aumento o que ya están disminuyendo, principalmente (1/100 y 1/200). El hallazgo de un animal con un título de 1/400 al serovar *icterohaemorrhagiae* podría sugerir una infección más reciente, pues en la prueba de MAT se logra un pico máximo de aglutinación a las 2 ó 3 semanas post infección (Radostits, 2002).

Por otra parte, en Huancayo, el 90 % (18/20) de las muestras positivas tuvieron un título de 1/100 y el 10 % restante (2/20) mostraron un título de 1/200. En este caso el hallazgo de animales con títulos de anticuerpos de 1/100 para el serovar *icterohaemorrhagiae* sugiere, también, infecciones recientes con concentraciones en aumento o descenso. En cambio el hallazgo de similares títulos para el serovar *hardjo*, adaptado al bovino, podría dar razón de infecciones agudas (Radostits, 2002).

Prescott *et al* (1988) y Lee *et al* (2002) han reportado a *L. pomona* como el serovar más prevalente seguido de *L. hardjo* en importancia. Esto difiere de lo hallado en nuestro estudio ya que el serovar más prevalente fue *L. icterohaemorrhagiae* seguido de *L. hardjo*. El porcentaje de seroprevalencia a *L. icterohaemorrhagiae* en el establo de Lima (14.7 %) coincide con el reportado por Prescott *et al* (1988), mas no con el orden de importancia hallado por nosotros.

El mayor porcentaje de animales reactivos al serovar *icterohaemorrhagiae*, una especie adaptada a los roedores, podría deberse a la presencia y contacto del ganado con la orina infectada de estos animales, principalmente. Estos animales son muy comunes en los centros de crianza bovina donde viven alimentándose de los granos (Radostits, 2002; Books *et al.*, 1998).

La detección del serovar *hardjo* es un hallazgo interesante ya que este es un serovar que usualmente no presenta sintomatología clínica evidente en el ganado bovino, y en el que mayormente ocasiona problemas de baja fertilidad y aborto. Además, este serovar reacciona pobremente a la prueba de micro aglutinación ya que su infección, por estar adaptado al ganado bovino, cursa con bajos títulos de anticuerpos (Prescott *et al*, 1988). Esto coincide con los bajos títulos obtenidos (tabla 2) en los 4 animales que resultaron positivos a la prueba. Su detección, únicamente, en el establo de Huancayo podría deberse a factores climáticos, tipo de suelo o animales silvestres de la zona (Prescott *et al*, 1988). Además, Ellis y Michna (1976) reportaron que no hubo respuesta serológica en casi el 25% de vacas con fetos abortados en los que se encontró este serovar.

Radostits (2002), Thierman (1984) y Prescott (1993) hallaron que la transmisión de la infección entre hospedadores de mantenimiento (como *L. hardjo* en bovinos de Huancayo) ocurre sin importar las condiciones climáticas y ambientales, por el contrario, para la transmisión desde un hospedador accidental si es necesaria la supervivencia del agente en el medio ambiente (*L. icterohaemorrhagiae* en ambas localidades).

El serovar *hardjo* es más común que el serovar *pomona* en el ganado lechero, comparado con el de carne, siendo la principal causa de aborto en Irlanda del Norte y en Inglaterra. En Canadá ocurre lo contrario al ser *pomona* el más seroprevalente. Esto podría deberse a la práctica de la monta natural en lugar de I.A. ya que se ha descubierto que *hardjo* se transporta en el tracto genital (Prescott *et al.*, 1988).

Se esperaba encontrar reactores al serovar *canicola*, por la presencia de perros en las localidades, pero no fue así; esto podría deberse a que los caninos no se encontraban infectados ni eliminando el agente o que la prueba no pudo detectar títulos a este serovar.

Por la amplia e importante distribución mundial del serovar *pomona* también se esperaba hallarlo en este estudio pero no fue así. Este serovar es el más común en el ganado lechero de Canadá (Prescott *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 2002). Esto difiere de lo hallado y podría deberse a que este serovar tiene como animales reservorio al ciervo y el mapache, animales silvestres no propios de nuestro medio (Heath y Jhonson, 1994). Hay que destacar que la MAT tiene una adecuada sensibilidad para detectar las infecciones por este serovar por lo que su no hallazgo serológico confirmaría su ausencia en ambas localidades.

4.4 Riesgo de Infección

El riesgo de infección (OR) se calculo tomando los datos obtenidos, según Daniel (2004):

	MAT +	MAT -	Total
Lima	13	75	88
Huancayo	20	143	163
Total	33	218	251

$$OR = 13 \times 143 / 75 \times 20 = 1.24$$

Estos datos indican que el riesgo de infección por leptospirosis en bovinos de Lima es 1.24 veces la infección para los de Huancayo; es decir que, por cada animal de Huancayo que se infecta hay 1.24 animales de Lima que lo hacen, indicando un mayor riesgo.

El riesgo de infección animal está asociado a diversos factores ambientales como precipitación pluvial y clima, factores del manejo y sistema de explotación como la crianza conjunta con otras especies productivas como porcinos o la presencia de animales domésticos y silvestres (perro y roedores, respectivamente). En nuestro estudio se podría sugerir que el mayor riesgo de infección hallado en Lima se debería a que las condiciones ambientales de la costa (clima templado y temperatura no extremas) resultan más favorables para la sobrevivencia de la leptospira en el suelo; además el sistema de crianza otorga menos espacio por animal en Lima respecto de Huancayo por lo que al haber un mayor contacto entre ellos sería más probable la infección (Radostits, 2002; Liceras *et al.*, 1981; Liceras *et al.*, 1989). Hay que notar que los animales en el IVITA-Huancayo sólo se concentran durante el ordeño y al dormir ya que el resto del día se encuentran pastando en terrenos amplios.

Debido a la mayor precipitación pluvial que ocurre en Huancayo se esperaba hallar una mayor prevalencia y riesgo de infección, pero esto no fue así. La causa estaría en que si bien caen más lluvias en la sierra, favoreciendo la supervivencia de leptospira en el suelo, estas son sólo estacionales. Además existe información que indica que la temperatura se relaciona más con la tasa de aislamiento que con un elevado nivel de precipitación (Radostits, 2002; INEI, 1994).

V. CONCLUSIONES

1. Se halló animales reactivos a *Leptospira spp.* a la prueba de micro aglutinación (MAT) tanto en Lima como en Huancayo.
2. El nivel de seroprevalencia hallado es ligeramente superior en la localidad de costa respecto que la localidad de sierra. Si bien los niveles de prevalencia de anticuerpos son bajos, comparados con los hallados en otros países, esto no descarta el probable rol de la Leptospirosis como una importante causa de fallas reproductivas.
3. No se halló animales reactivos a los serovares *canicola* ni *pomona* pese a la presencia de sus reservorios (perros).
4. Se halló respuesta serológica frente a *L. icterohaemorrhagiae* en los establos tanto de Lima como de Huancayo, esto podría deberse a la presencia de roedores, reservorio de *L. icterohaemorrhagiae*, en ambas localidades.
5. Se detectó anticuerpos frente a *L. hardjo* en el establo del IVITA-Huancayo. Este serovar está adaptado al bovino las infecciones tienden a ser crónicas, con eliminación prolongada del agente a través de la orina.
6. Los títulos de anticuerpos hallados son en su mayoría de 1/100 y 1/200, que no aclaran si se trata de infecciones recientes (con títulos crecientes) o crónicas (con títulos en descenso), pero que se consideran como bajos.
7. El riesgo de infección es ligeramente superior para el establo de Lima respecto del de Huancayo. Esto podría deberse a factores climáticos o de manejo, como una temperatura más benigna para la sobrevivencia de *Leptospira* o el menor espacio por animal que favorece la infección, en la costa.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar más estudios de seroprevalencia con la prueba de micro aglutinación (MAT), de modo periódico y ampliando el rango de serovares de leptospira, para determinar la seroprevalencia de otros serovares.
2. Controlar la presencia de roedores y su contacto con los animales y el ganado para evitar la infección de la enfermedad.
3. Evitar el mantenimiento de charcos o depósitos de agua estancada que sirven como reservorio y fuente de infección para leptospirosis.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Acha P. N.; B. Szyfres. 1986.** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2ª Ed. p 112-120. OPS-OMS. Publicación científica N° 503. Washington. U.S.A.
2. **Adler, B.; A. Murphy; S. Locarnini; S. Faine. 1980.** Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J Clin Microb. 11 (5): 452-457.
3. **Ahlbom, A; S. Norell. 1992.** Fundamentos de epidemiología. 3a ed. P7. Ed Siglo XXI, Madrid, España.
4. **Artiushin, S.; J. Timoney; J. Nally; A. Verma. 2004.** Host-inducible immunogenic sphingomyelinase-like protein, Lk73.5, of *Leptospira interrogans*. Infection and Immunity. 72(2):742-749.
5. **Bajani, M.; D. Ashford; S. Bragg; C. Woods; T. Aye; R. Spiegel; B. Plikaytis; B. Perkins; M. Phelan; P. Levett; R Weyant. 2003.** Evaluation of four C commercially available rapid serologic tests for diagnosis of Leptospirosis. J Clin Microb., 41 (2):803-809.
6. **Bolin, A.; R. Zuerner. 1996.** Correlation between DNA restriction fragment length polymorphisms in *Leptospira interrogans* serovar Pomona type Kennewicki and host animal source. J Clin Microb., 34 (2):424-425.
7. **Booth, N.; L. Mc Donald. 1988.** Farmacología y terapéutica veterinaria. 5ª ed. Vol II. p 67-72. Ed Acirbia S.A. Zaragoza. España.
8. **Brock, T. 1993.** Microbiología. 6ª ED. p 596-597, 800-805. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana S.A. México
9. **Brooks, G. F.; J. S. Butel; S.A. Morse. 1998.** Microbiología médica de Jawetz, Melnick, y Aldergerg. 16va ed. p 230-231. Editorial El Manual Moderno. México.
10. **Céspedes, M.; M. Ormaeche; P. Condori; L. Balda; M. Glenny. 2003.** Prevalencia de Leptospirosis y Factores de Riesgo en personas con antecedentes de fiebre en la provincia de Manu, Madre de Dios, Perú. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 20 (4):180-185
11. **Cole, J.; C. Sulzer; A. Pursell. 1973.** Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. Appl Microb., 25:976-980.

- 12. Cruz, R.; F. Fernández; H. Arévalo; 2002.** Hiperendemicidad de Leptospirosis y Factores de Riesgo Asociados em Localidades Arroceras del Departamento de San Martín-Perú. Ver Peru Med Exp Salud Pública. 19 (1):10-16
- 13. Daniel, W.W. 2004.** Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4^a Ed. P 606-624. Limusa Wiley. México.
- 14. Ellis, W.A.; S.W. Michna. 1976.** Bovine Leptospirosis: Infection by the Hebdomadis-a herd study. Vet Rec. 99:409-412
- 15. Ellis, W.A.; J. O'Brien; J. Cassells. 1981.** Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in Northern Ireland. Vet Rec.108: 555-557.
- 16. Ellis, W.A. 1983.** Recent developments in bovine Leptospirosis. Vet. Annu. 23: 91-95.
- 17. Ellis, W.A.; J. O'Brien; D. Bryson; D. Mackie. 1985.** Bovine leptospirosis: some clinical features of serovar hardjo infection. Vet Rec. 117: 101-104
- 18. Ellis, W.A. 1986.** The diagnosis of Leptospirosis in farm animals, In: Ellis W.A., Little T.W.A. (Eds.) Present state of Leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff Publishers, 13-31.
- 19. Ellis, W.A.; J.G. Songer; L. Montgomery; J.A. Cassells. 1986.** Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar hardjo in the genital and urinary tracts of non pregnant cattle. Vet Rec. 118:11-13.
- 20. Ellis, W.A. 1994.** Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Vet. Clin. North. Am., Food Anim. Pract. 10:463-478.
- 21. Gallego, M.I.; J. Gallego, E. Cortes, J. Rojas, S. Ruiz, T. Bustos. 1996.** Evaluación de técnicas de inhibición de crecimiento en la evaluación de vacunas contra leptospirosis. Memorias Congreso Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Santa Marta-Colombia.
- 22. Gatti, M.; D. Arias; C. Rosetti; S. Selva; J. Copes; R. Laplace; P. Martino; K. Pellicer; N. Stanchi. 2004.** Investigación de Leptospiras en aguas de lagos del zoológico de la Plata, Argentina. Analecta Veterinaria. 24(1):18-20.

23. **Gázquez, A. 1991.** Patología Veterinaria. 339-346. Ed. Interamericana Mc Graw-Hill. España .Madrid.
24. **Gillespie, R.W. ; Ryno, J. 1963.** Epidemiology of Leptospirosis. Am J Public Health. 53:950-955.
25. **Godoy, S.; O. Mosquera; C. Sánchez. 1997.** Prevalencia de leptospirosis por época en bovinos doble propósito en el Municipio Torres, parroquia Las Mercedes, Estado de Lara. Arch. Latinoam. Prod. Ani. 5 (Supl. 1):589-561
26. **Goldstein, S.; N. Charon. 1988.** Motility of the spirochete *Leptospira*. Cell Motil. Cytoskeleton. 9:101–110
27. **Gonzales A.; R. Borrero; J. Ruiz; N. Batista; Y. Fernández; Y. Valdez; M. Gonzales.2006.** Medio EJM modificado para el cultivo de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. Revista Argentina de Microbiología. 38: 61-68.
28. **Heath S.E.; R. Johnson .1994.** Leptospirosis. JAVMA 205, 1518-1523.
29. **Hickey, W. P. 2002.** Leptospirosis.
Disponible en: <http://www.emedicine.com/PED/topic1298.htm>. Revisado 10/10/2006
30. **INEI. 1994.** Censo agropecuario. Disponible en: <http://www.inei.gob.pe>
Revisado 10/10/2006
31. **Johnson, R. C.; J. Walby; R. Henry; N. Auran. 1973.** Cultivation of Parasitic Leptospire: Effect of Pyruvate. Applied Microbiology. 26(1): 118-119.
32. **Jubb K.1985.** Patología de los animales domésticos. Tomo II –III. Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur. Mexico. pp 159-163, 396,397,434
33. **Jungherr, E.1944.** Bovine Leptospirosis. J.A.V.M.A., 105, 27.
34. **Kmety, E. and Dikken, H. 1993.** Classification of the species of *Leptospira interrogans* and history of its serovars. University Press Groningen. Groningen, The Neatherlands.
35. **Ko, A.I.; M. Galvão; C. Ribeiro; W. Johnson; L. Riley; The Salvador Leptospirosis Study Group. 1999.** Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Lancet. 354:820-25
36. **Koneman, E. W.; S.D. Allen;W.M. Janda;P.C. Schreckenberger; W.C. Winn. 1999.** Diagnóstico Microbiológico. 5ª ed. p 927-954. Editorial Médica Panamericana. Argentina.

37. **Langoni, H.; L. Meireles; S. Gottschalk; K. Cabral; A. Da Silva. 2002.** Perfil sorológico da leptospirose bovina em regiões do Estado de São Paulo. Arq. Inst. Biol. 67(1):133-137
38. **Lee, S. H.; S. Kim; S. Park; M. Kim. 2002.** Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. Infection and Immunity. 70:315–322.
39. **Leonard, F., Quinn, P.J. and Ellis, W.A. 1993.** Association between cessation of leptospiruria in cattle and urinary antibody levels. Res. Vet. Sci. 55, 195-202.
40. **Levett, P. N. 2001.** Leptospirosis. Clin. Microbio. Rev., 14(2):296-326.
41. **Liceras, J.; R, Hidalgo; M. Florez. 1981.** Leptospirosis em Tingo María, Departamento de Huánuco, Perú. Estudio em el hombre y animales domésticos. Boletín de La Oficina Sanitaria Panamericana. 90:430-439.
42. **Liceras, J.; K. Sulzer. 1984.** Six New Leptospiral Serovars Isolated From Wild Animals In Peru. Journal of Clinical Microbiology. 19(6): 944-945
- 43 **Liceras, J.; S. Valdivia; E. Higuchi. 1989.** Leptospirosis en el Perú. En: Anales Seminario Nacional Zoonosis y Enfermedad de Transmisión alimentaria. p. 7-20.
- 44 **Lilenbaum, W.; P. Ristow; S. Almeida; E. Domingos da Silva. 2002.** Evaluation of a rapid slide agglutination test for the diagnosis of acute canine leptospirosis. Rev Latinoam Microb. 44: 124 –128.
45. **Lin, M.; O. Surujballi; K. Nielsen; S. Nadin-Davis; G. Randall. 1997.** Identification of a 35-Kilodalton Serovar-Cross-Reactive Flagellar Protein, FlaB, from *Leptospira interrogans* by N-Terminal Sequencing, Gene Cloning, and Sequence Analysis. Infection and Immunity. 65(10):4355–4359
46. **Lupidi, R.; M. Cinco, D. Balancín; E. Delprete; P. Varaldo. 1991.** Serological follow-up of patients involved in a localized outbreak of Leptospirosis. J Clin Microb., 29 (4):805-809.
47. **Madigan M.T.; J.M. Martinko; J. Parker. 2004.** Brock biología de los microorganismos.10ª ed. p 432-435. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana S.A. México
48. **Michin, N.A.; S. Azinov. 1935.** Spirochaetal jaundice of cattle in North Caucasus. Sov. Med.10, 23-27 (Abstr. Vet. Bull., &, 1937,419)

- 49. Midwinter, A.; T. Vinh; S. Faine; B. Adler. 1994.** Characterization of an antigenic oligosaccharide from *Leptospira interrogans* Serovar pomona and Its Role in Immunity. Infection and Immunity. 62 (12): 5477-5482.
- 50. Nascimento, A; A. Ko; E. Martins; C. Monteiro-Vitorello; P. Ho; D. Haake; S. Verjovski-Almeida; R. Hartskeerl; M. Marques; M. Oliveira; C. Menck; L. Leite; H. Carrer; L. Coutinho; W. Degraeve; O. Dellagostin; H. El-Dorry; E. Ferro; M. Ferro; L. Furlan; M. Gamberini; E. Giglioti; A. Góes-Neto; G. Goldman; M. Goldman; R. Harakava; S. Jerônimo; I. Junqueira-de-Azevedo; E. Kimura; E. Kuramae; E. Lemos, M. Lemos; C. Marino; L. Nunes; R. de Oliveira; G. Pereira; M. Reis; A. Schriefer; W. Siqueira; P. Sommer; S. Tsai; A. Simpson; J. Ferro; L. Camargo; J. Kitajima; J. Setubal; M. Van Sluys. 2004.** Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. J Bacter., 186 (7):2164–2172.
- 51. Nelson, D.L.; M. Cox. 2001.** Lehninger Principios de Bioquímica. 3ª ed. P 604-613. Ediciones Omega. Barcelona
- 52 Nilson, G. 2003.** Avaliação da infecção por *Leptospira* em fêmeas bovinas enviadas ao abate no norte de Paraná, a través de diferentes técnicas diagnósticas. Tesis doctorado. Fac. Med. Veter. Zoot. USP, São Paulo, Brasil. 75p.
- 53. Noel K.; J. Holt. 2001.** Bergey`s manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins..p 62-69. Baltimore
- 54. Ochoa, E.J.; A. Sánchez; E. Ruiz. 2000.** Epidemiología de la leptospirosis en una zona andina de producción pecuaria. Rev Panam Salud Publica, 7(5):325-331.
- 55. Oie S.; A. Koshiro; H. Konishi; Z. Yoshii. 1986.**In vitro evaluation of combined usage of fosfomycin and 5-fluorouracil for selective isolation of *Leptospira* species. J Clin Microb., 23:1084-1087.
- 56. Okuda, M.; Y. Sakai; M. Matsuuchi; T. Oikawa; M. Watanabe; K. Itamoto; H. Iwata; R. Kano; A. Hasegawa; T. Onishi; Inokuma H. 2005.** Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay for the detection of canine *Leptospira* antibodies using recombinant Omlp1 protein. J Vet Med Sci., 67(3):249-254.
- 57. O.P.S./O.M.S. 2001.** Guia de control y manejo de Leptospirosis. 24-43 p. Uruguay.

- 58. Planck, R.; D. Dean. 2000.** Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. In humans. *Microbes and Infection*. 1265-1276.
- 59 Prescott, J.; R. Miller; V. Nicholson; S. Martin; T. Lesnick. 1988.** Seroprevalence and association with abortion of Leptospirosis in Cattle in Ontario. *Can J Vet Res.*, 52: 210-215.
- 60. Prescott, J.F. 1993.** Leptospirosis, En: Jubb K.V.F., P.C. Kennedy; N.Palmer. 1992. *Pathology of domestic animals*. Academic Press, Inc, 4a ed. p. 503-511. San Diego-California.
- 61. Radostits, O. 2002.** *Medicina Veterinaria*. Novena ed. Vol I. p.1150-1168. Ed. Mc Graw Hill. Interamericana. España. Madrid.
- 62. Ramadass, P.; B. Jarvis; R. Corner; D. Penny; R. Marshall. 1992.** Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. *Int J Syst Bacteriol* 42:215–219.
- 63. Ramadass, P.; B. Samuel; K. Nachimuthu. 1999.** A rapid látex agglutination test for detection of leptospiral antibodies. *Veterinary Microbiology*. 70:137-140.
- 64 Rivera, H. 2001.** Etiología infecciosa del aborto bovino. RIVEP. XXIV Reunión Científica Anual Peruana de Producción Animal. Suplemento 1:95-99
- 65. Smith, D. T. L. and Perry, D.A. 1952.** Bovine Leptospirosis. *Can. Jour. Comp. Med.*, 16, 294-299.
- 66. Smith, C.R., Comey, B.G., McGowan, M.R., McClintock, C.S, Ward, W. and Ketterer, P.J. 1997.** Amoxicillin as an alternative to dihydristreptomycin sulphate for treating cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo*. *Aus. Vet J.*, 75:818-821
- 67. Stamm, L.; F. Gherardini; E. Parrish; C. Moomaw. 1991.** Heat Shock Response of Spirochetes. *Infection and Immunity*. 59(4):1572-1575
- 68. Silva, M.; E. Camargo; L. Batista; A. Vaz; A. Brandão; P. Nakamura; J. Negrão. 1995.** Behaviour of specific IgM, IgG and IgA class antibodies in human leptospirosis during the acute phase of the disease and during convalescence. *J. Trop. Med. Hyg.* 98:268–272.
- 69. Thiermann, A.B. 1984.** Leptospirosis: current developments and trends. *JAVMA*. 184: 722-725

- 70. Timoney, J.F., Gillespie, J.H., Scott, F.W. and Barlough, J.E. 1988.** The Spirochetes, In: Hagan & Bruner's Microbiology and infectious diseases of domestic animals. Comstock Publishing Associates, Ithaca, USA, 8th edition, 45-57.
- 71. Tripathy, D.N.; L.E. Hanson, W.A. Krumrey. 1972.** An in vitro growth inhibition test for leptospiral neutralization. Proc 75th Ann Meet. US. Animal Health Assoc. pp138-143.
- 72. Van der Hoeden J. 1958.** Epizootiology of Leptospirosis. Adv. Vet. Sci. 4,278-339.
- 73. Victoria, B.; C. Fernandez; J.E. Rodríguez; A.M. Obregón; I. Rodríguez. 2002.** Identificación de aislamientos de *Leptospira* por métodos serológicos y genéticos. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Rev. Cubana med Trop. 54(1):48-51
- 74. Wood, J.; R. Johnson; K. Palin. 1981.** Surface Colonies of *Leptospira interrogans*. J Clin Microb., 13(1):102-105.
- 75. World Health Organization. 1999.** Leptospirosis worldwide, 1999. Wkly. Epidemiol. Rec. 74:237-242
- 76. Yasuda, P.; A. Steigerwalt; K. Sulzer; A. Kaufmann; F. Rogers; D. Brenner. 1987.** Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. Int. J Syst Bacter., 37:407-415.